

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001 年 7 月 26 日 (26.07.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/53253 A1

(51) 国際特許分類: C07C 231/24, 233/09,
C12P 13/02 // C07C 231/06, C12N 15/60, (C12N 15/60,
C12R 1:19) (C12P 13/02, C12R 1:19)

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/00131

(22) 国際出願日: 2001 年 1 月 12 日 (12.01.2001)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2000-7993 2000 年 1 月 17 日 (17.01.2000) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 三井化学株式会社 (MITSUI CHEMICALS, INC.) [JP/JP]; 〒100-6070 東京都千代田区霞が関三丁目2番5号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 阿部剛也 (ABE,

Takeya) [JP/JP]. 佐々木賢樹 (SASAKI, Kenju) [JP/JP]. 渡辺清一 (WATANABE, Seiichi) [JP/JP]; 〒297-8666 千葉県茂原市東郷1900番地 三井化学株式会社内 Chiba (JP). 伊藤 深 (ITOU, Kiyoshi) [JP/JP]. 浅野保 (ASANO, Tamotsu) [JP/JP]; 〒297-0017 千葉県茂原市東郷1144番地 三井化学株式会社内 Chiba (JP).

(74) 代理人: 苗村新一 (NAEMURA, Shinichi); 〒221-0056 神奈川県横浜市神奈川区金港町5番地, 36 東興ビル5 階 Kanagawa (JP).

(81) 指定国 (国内): KR, US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (DE, FR, GB, NL).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF PURIFYING AMIDE COMPOUND

(54) 発明の名称: アミド化合物の精製方法

(57) Abstract: A method of efficiently eliminating impurities contained in an amide compound-containing solution (in particular, an amide compound-containing solution prepared by hydrating a nitrile compound by using optionally processed microbial cells containing nitril hydratase) which comprises bringing the solution into contact with active carbon under acidic conditions.

(57) 要約:

本発明は、アミド化合物含有液、特にニトリルヒドラターゼを含有する微生物菌体、または該微生物菌体の処理物を用いてニトリル化合物の水和反応で製造されたアミド化合物含有液を、酸性の条件下において、活性炭と接触処理することにより、アミド化合物含有液中に含まれる不純物を効率的に除去する方法を提供する。



WO 01/53253 A1



明 細 書

アミド化合物の精製方法

5 技術分野

本発明はアミド化合物の精製方法に関する。より詳しくは、アミド化合物の含有液を活性炭を用いて処理することにより、効率的に純度の高いアミド化合物を得る方法に関する。

10 背景技術

アミド化合物、特にニトリル化合物を水和して得られるアミド化合物生成液中にはその製法により種類は異なるものの、通常は高分子物質や界面活性剤、着色分、溶出物、または他の不純物等が存在する。これらを除くために、例えば特開昭61-115495号公報および特開昭61-122253号公報（EP-A-182578号公報）には活性炭による精製処理方法が、特開昭61-115058号公報にはイオン交換膜による精製処理方法が、また特開昭61-122227号公報（EP-A-188068号公報）には多孔質中空糸膜による精製処理方法が記載されている。

しかしながら、上記イオン交換膜や多孔質中空糸膜を用いた精製方法では特殊な精製装置が必要となる等、その実施において、経済性の面でのデメリットは避けられない。

また、活性炭による精製方法においては、通常は特殊な設備は必要ないものの、得られる製品中にはなお不純物が存在し、効果の点で未だ不十分である。特に、ニトリル水和能を有する酵素であるニトリルヒドラーゼ等を用いてニトリル化合物を直接水和してアミド化合物を製造する場合、上記先行技術の活性炭による精製方法では、反応液中に混入する微生物等に由来する蛋白質の除去が不十分であり、その結果、その量が微量であれば、反応液が発泡し易くなり、また多くなれば反応液が白濁することとなり、製品品質に悪影響を及ぼす。

従って、本発明の課題は、アミド化合物含有液中に含まれる不純物を効率的に

除去する方法を提供することにある。より具体的には、本発明は、ニトリル化合物から対応するアミド化合物を製造する際に得られるアミド化合物含有液を、活性炭を用いて処理する場合の、簡便でかつ効率的な精製方法を提供することを課題とする。

5

発明の開示

本発明者らは、前述のアミド化合物含有液の活性炭を用いた精製方法に関して鋭意検討を行なってきたところ、アミド化合物含有液を酸性条件下で活性炭と接触することにより、更には特定な pH の領域において活性炭と接触することにより、該アミド化合物含有液中に含まれる不純物、特に蛋白質を、極めて効率的に除去しうることを見出した。

特に従来知見では、アミド化合物が不飽和結合を持つもの（例えば産業上比較的重要な化合物であるアクリルアミド、メタクリルアミド等）は、酸性領域では重合反応が起こりやすく、化合物が不安定になってしまうことが知られており、これを避けるため、アミド化合物を含む溶液はを中性に保つことが重要とされてきた。このような観点からも、上記条件下による精製処理技術は従来技術から到底予想し得ないことであつた。

すなわち、本発明は、

(1) アミド化合物含有液を酸性条件下で活性炭と接触させることを特徴とするアミド化合物の精製方法であり、また、

(2) アミド化合物含有液が、対応するニトリル化合物の水和反応により得られる生成液である上記 (1) に記載の精製方法であり、また、

(3) アミド化合物が炭素数 2 ～ 20 のものである、上記 (2) に記載の精製方法であり、また、

(4) アミド化合物が不飽和結合を有するものである、上記 (3) に記載の精製方法であり、また、

(5) アミド化合物が、ニトリルヒドラターゼを含有する微生物菌体、または該微生物菌体の処理物を用いてニトリル化合物の水和反応で製造されたものである、上記 (2) または (3) に記載の精製方法であり、また、

(6) 微生物菌体が、微生物よりクローニングしたニトリルヒドラーゼ遺伝子を任意の宿主で発現させた形質転換体である、上記(5)に記載の精製方法であり、また、

5 (7) アミド化合物が、ニトリルヒドラーゼを含有する微生物菌体、または該微生物菌体の処理物を用いてニトリル化合物の水和反応で製造されたものである、上記(4)に記載の精製方法であり、また、

(8) 微生物菌体が、微生物よりクローニングしたニトリルヒドラーゼ遺伝子を任意の宿主で発現させた形質転換体である、上記(7)に記載の精製方法であり、また、

10 (9) アミド化合物がアクリルアミドまたはメタクリルアミドである、上記(7)に記載の精製方法であり、また、

(10) アミド化合物がアクリルアミドまたはメタクリルアミドである、上記(8)に記載の精製方法であり、また、

15 (11) 活性炭との接触時のアミド化合物含有液のpHが3.5～6.5である、上記(9)または(10)に記載の精製方法であり、また、

(12) 酸解離指数3.5～5.5の有機酸、または該有機酸と塩基を用いてアミド化合物含有液を酸性に調製することを特徴とする、上記(11)に記載の精製方法であり、また、

20 (13) 有機酸がアクリル酸またはメタクリル酸である、上記(12)に記載の精製方法であり、また、

(14) 活性炭が、木質またはヤシ殻を原料とした活性炭である、上記(13)に記載の精製方法であり、また、

(15) 活性炭との接触時の温度が10～50℃である、上記(14)に記載の精製方法であり、また、

25 (16) アミド化合物含有液を活性炭と接触させた後のアミド含有液から活性炭を分離した液を飽和温度以下として結晶を析出させることを特徴とする、上記(15)に記載の精製方法である。

発明を実施する最良の形態

本発明におけるアミド化合物含有液は特に限定されるものではなく、具体的には炭素数が2～20程度のニトリル化合物を水和し、得られるアミド化合物含有生成液であるものが挙げられる。水和反応に供されるニトリル化合物としては、広い範囲のニトリル、たとえば脂肪族ニトリル、芳香族ニトリルなどが含まれる。

- 5 脂肪族ニトリルとしては、炭素数2～6の飽和または不飽和ニトリル、たとえば、アセトニトリル、プロピオニトリル、ブチロニトリル、イソブチロニトリル、バレルニトリル、イソバレロニトリル、カプロニトリルなどの脂肪族飽和モノニトリル類；マロノニトリル、サクシノニトリル、アジポニトリルなどの脂肪族飽和ジニトリル類；アクリルニトリル、メタアクリロニトリル、クロトノニトリルなどの脂肪族不飽和ニトリルなどが挙げられる。芳香族ニトリルとしては、ベンゾ
10 ニトリル、*o*-, *m*-, および *p*-クロロベンゾニトリル、*o*-, *m*-, および *p*-フルオロベンゾニトリル、*o*-, *m*-, および *p*-ニトロベンゾニトリル、*o*-, *m*-, および *p*-トルニトリル、ベンジルシアナイド等が挙げられる、特に、アクリロニトリルやメタクリロニトリル等のような、不飽和結合を持つニトリル化合物を水和することにより得られる、アクリルアミドやメタクリルアミド
15 を含む水溶液に対して、本発明の精製方法は好適である。

- 本発明において、処理の対象とされるアミド化合物含有液に関しては、既知のいずれの水和方法により得られたものであっても構わない。すなわち、硫酸による水和法や、ラネー銅触媒等の金属銅を含む触媒による接触水和法、ニトリル化
20 合物を水和する能力を有する酵素（ニトリルヒドラターゼ）およびこれを含有する微生物菌体、それらの酵素および微生物菌体処理物等を用いて水和したもの等、いずれであっても構わない。

- なかでも、ニトリル化合物を水和する能力を有する酵素であるニトリルヒドラターゼ、ニトリルヒドラターゼの処理物、ニトリルヒドラターゼを含有する微生物菌体、あるいは該微生物菌体の処理物等を用いて得られるアミド化合物含有液
25 は、本発明の精製方法に好適である。

なお、上記におけるニトリルヒドラターゼとは、ニトリル化合物を加水分解して対応するアミド化合物を生成する能力をもつ酵素をいう。

ここで、ニトリルヒドラターゼを含有する微生物としては、ニトリル化合物を

- 加水分解して対応するアミド化合物を生成する能力を有するニトリルヒドラターゼを産生し、かつ30重量%のアクリルアミド水溶液中でニトリルヒドラターゼの活性を保持している微生物であれば、特に制限されるものではない。具体的には、ノカルディア (*Nocardia*) 属、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属、バチルス (*Bacillus*) 属、好熱性のバチルス属、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属、ミクロコッカス (*Micrococcus*) 属、ロドクロウス (*rhodochrous*) 種に代表されるロドコッカス (*Rhodococcus*) 属、アシネトバクター (*Acinetobacter*) 属、キサントバクター (*Xanthobacter*) 属、ストレプトマイセス (*Streptomyces*) 属、リゾビウム (*Rhizobium*) 属、クレブシエラ (*Klebsiella*) 属、エンテロバクター (*Enterobacter*) 属、エルウィニア (*Erwinia*) 属、エアロモナス (*Aeromonas*) 属、シトロバクター (*Citrobacter*) 属、アクロモバクター (*Achromobacter*) 属、アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) 属またはサーモフィラ (*thermophila*) 種に代表されるシュードノカルディア (*Pseudonocardia*) 属に属する微生物を好適な例として挙げることができる。
- また、該微生物よりクローニングしたニトリルヒドラターゼ遺伝子を任意の宿主で発現させた形質転換体も本発明でいう微生物に含まれる。なお、ここでいう任意の宿主には、後述の実施例のように大腸菌 (*Escherichia coli*) が代表例として挙げられるが、とくに大腸菌に限定されるのものではなく枯草菌 (*Bacillus subtilis*) 等のバチルス属菌、酵母や放線菌等の他の微生物菌株も含まれる。その様なものの例として、MT-10822 (本菌株は、1996年2月7日に茨城県つくば市東1丁目1番3号の通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM BP-5785として、特許手続き上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約に基づいて寄託されている) が挙げられる。また、組換えDNA技術を用いて該酵素の構成アミノ酸の1個または2個以上を他のアミノ酸で置換、欠失、削除もしくは挿入することにより、アミド化合物耐性やニトリル化合物耐性、温度耐性を更に向上させた変異型のニトリルヒドラターゼを発現させた形質転換体も、本発明でいう微生物に含まれる。

上記したような微生物を用い、アミド化合物を製造するに際しては通常、該微生物の菌体あるいは菌体処理物を用いる。菌体は、分子生物学、生物工学、遺伝

子工学の分野において公知の一般的な方法を利用して調製すればよい。例えば、LB培地やM9培地等の通常液体培地に該微生物を植菌した後、適当な培養温度（一般的には、20℃～50℃であるが、好熱菌の場合は50℃以上でもよい）で生育させ、続いて、該微生物を遠心分離によって培養液より分離、回収して得る方法が挙げられる。

また、本発明における微生物の菌体処理物は、上記微生物菌体の抽出物や磨砕物、該抽出物や磨砕物のニトリルヒドラーゼ活性画分を分離精製して得られる後分離物、該微生物菌体や該菌体の抽出物、磨砕物、後分離物を適当な担体を用いて固定化した固定化物等を指し、これらがニトリルヒドラーゼの活性を有している限りは本発明の菌体処理物に相当する。

本発明が精製の対象とするアミド化合物において、ニトリルヒドラーゼを含有する微生物菌体、あるいはその微生物菌体の処理物を用い、ニトリル化合物を水和してアミド化合物を得る場合の反応形式は、対応するニトリル化合物を回分反応に供する方法でもよいし、連続反応であってもよい。また、反応の形式も特に限定はなく、例えば懸濁床として行なってもよいし、固定床であってもよい。この際の反応液中での触媒、例えば微生物の菌体または菌体処理物の濃度は、水性媒体とニトリル化合物の混合に支障をきたさない限り、特に制限されるものではない。

上記において、ニトリル化合物を反応開始時に添加する場合のニトリル化合物の濃度は、該ニトリル化合物の飽和濃度以上であればよい。一方、その濃度の上限は特に限定されるものではなく、想定する反応終了時のアミド化合物濃度およびニトリル化合物濃度により任意に決定すればよい。

また、未反応のニトリル化合物は、反応後に蒸留等の手段により反応液より除去することもできる。よって、想定する反応終了時のアミド化合物濃度に達した時点でもニトリル化合物が過剰となるようにニトリル化合物を添加することもできる。

具体的には、例えばニトリル化合物がアクリロニトリルである場合、水に対する本化合物の飽和濃度は20℃で約7重量%であるので、約7重量%以上が好適である。また、メタクリロニトリルまたはクロトンニトリルがニトリル化合物で

ある場合、水に対するこれらの化合物の飽和濃度は20℃で約2重量%であるので、約2重量%以上が好適である。

上記におけるアミド化反応は通常は常圧下で行われるが、水性媒体中へのニトリル化合物の溶解度を高めるために加圧下で行うこともできる。また、反応温度は、水性媒体の凝固点以上であれば特に制限はされないが、触媒がニトリルヒドラーターゼを含む場合は、好ましくは0～50℃、より好ましくは10～30℃の範囲内で行われる。

また、上記におけるアミド化反応時の反応液のpHは、ニトリルヒドラーターゼ活性が維持されている限りは特に制限されるものではないが、好ましくはpH6～10の範囲、より好ましくはpH7～9の範囲である。

本発明におけるアミド化合物の精製は、アミド化合物を含有する液を酸性下に、好ましくはpH2以上、より好ましくはpH3.5～6.5の範囲にて活性炭と接触させることにより行う。

本発明において、アミド化合物含有液を酸性とするには通常、該アミド化合物含有液に酸を添加する必要があるが、その酸の種類としてはアミド化合物の安定性に影響を与えるものでなければ広い範囲のものが使用でき、例えば硫酸や硝酸等のような鉱酸、あるいは酢酸やアクリル酸のような有機酸等が挙げられ、二種以上が用いられても構わない。これらのうちでも、本発明では、よりpH調製が容易でかつ安定し、しかもより高い精製効果およびアミド化合物の安定性を得る上から弱酸の使用が効果的であり、更にはpH緩衝効果をも持たせる上から、弱酸と塩基との両方を用いて上記pH範囲に調製することが、非常に好ましい。

好ましく用いられる弱酸としては、pH制御範囲を考慮すると、酸解離指数(pKa; 25℃、水中)が2.0～6.0のものが好ましく、更には3.5～5.5であるものがより好ましい。これら酸の代表的なものとしては酢酸、プロピオン酸、オクタン酸、吉草酸等の脂肪族飽和モノカルボン酸、アクリル酸、クロトン酸、メタクリル酸等の脂肪族不飽和モノカルボン酸、シュウ酸、アジピン酸、コハク酸、マレイン酸等の脂肪族ポリカルボン酸、安息香酸等の芳香族カルボン酸等が挙げられる。また、上記塩基としては強塩基であるものが好ましく、水酸化ナトリウムや水酸化カリウム等が挙げられる。

また本発明において、処理の対象とするアミド化合物が、特に不飽和結合を持つようなものである場合は、精製後にそれが重合反応に供される際に、得られた重合物中に酸が残存、あるいは遊離したりする不都合を生ずることになる。このため、上記のような不飽和結合を有するアミド化合物が精製対象となる場合は、

5 酸としては不飽和結合を有するものであってかつ、当該アミド化合物と共重合することが可能なもの、具体的にはアクリル酸やメタクリル酸、あるいはクロトン酸等を使用することが好ましい。

本発明において、上記酸、または上記酸と塩基の濃度は、アミド化合物含有液の性状および用いる酸の pK_a にもよるが、酸換算でアミド化合物含有液に対し、

10 通常 10 重量 ppm ～ 5 重量 % の範囲である。

また、本発明では上記した酸性条件下に該アミド化合物含有液を活性炭と接触させるが、活性炭と接触している際にアミド化合物含有液が酸性となっている、あるいは酸性とする形態であれば特に限定はなく、活性炭の添加と同時にアミド化合物含有液を酸性下に調製する方法であっても何ら構わない。

15 本発明で使用する活性炭については特に限定はなく、粉状および粒状のいずれであっても使用することができる。また、精製処理を行う装置においても、用いる活性炭の粒度に適したものをを用いればよい。例えば粉状活性炭を用いる場合は、液の攪拌が可能な槽において、回分式および連続式のいずれでも実施することができる。また、粒状活性炭を用いるような場合は、上記形式の他に、充填塔形式

20 による連続処理も可能である。

また、活性炭には一般的には、原料として石炭、木、およびヤシ殻等を用いたもの等があるが、吸着能を有するものであれば特段の限定はなく、いずれのものであっても使用することが可能である。

しかしながら、処理の対象とするアミド化合物が特に不飽和結合を有するものである場合は、該アミド化合物の保存安定性や重合し易さ等を考慮すると、活性炭としては金属分含有量の少ないものを使用することが好ましく、原料が木質のもの、またはヤシ殻のものを使用することがより好ましい。

25

本発明において、アミド化合物を精製処理する際に使用する活性炭量は、あまり少ない場合は十分な精製効果を得ることが困難であり、またあまり多く使用し

ても不経済となることから、その使用量としてはアミド化合物含有液に対して、通常0.01～20重量%の範囲、より好ましくは0.05～10重量%の範囲である。

また、活性炭として特に粉状のものをを用いる場合、該活性炭はアミド化合物含有液中にそのまま直接添加してもよく、または一旦、活性炭を水等の媒体中に分散させ、スラリー状としたものをアミド化合物含有液に添加、あるいは供給するようにしてもよい。

本発明において、活性炭によりアミド化合物含有液を精製処理する際の温度は、アミド化合物の結晶が析出せずに、かつその安定性に影響のない範囲であれば特に制限はないが、通常は0～80℃の範囲で行われる。特にアクリルアミドやメタクリルアミド含有液のような、不飽和結合を有するアミド化合物含有液を精製処理する場合は、重合反応生起によるゲル化を防止するために60℃以下、更には10～50℃の範囲にて、活性炭と接触させることが好ましい。また、活性炭との接触処理に要する時間は、処理形式や活性炭の量にもよるが、通常は0.5～20時間の範囲である。

次いで、本発明では上記接触処理したアミド化合物含有液から活性炭を分離し、該アミド化合物含有液の精製液を得る。活性炭を分離する方法としては、一般に用いられる固液分離装置を用いる方法であれば特に限定はなく、例えば加圧濾過器、減圧濾過器、または遠心分離器等があげられ、更には回分式および連続式のいずれであっても構わない。

また、本発明においては上記活性炭を分離した後のアミド化合物含有液を冷却し、液中より目的のアミド化合物を晶析させるという方法を採用することにより、更なる精製されたアミド化合物を得ることも可能である。

また、本実施例ではニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得を部位特異的な変異によって行っている。しかし、実施例において開示される変異点と置換される塩基の種類に基づいて、部位特異的な変異以外の方法で組換えプラスミドを構築し、それを宿主細胞に導入しても、本実施例と同様の結果を得ることが可能である。

例えば、実施例において開示される変異点に相当する領域のDNAの塩基配列

がアミノ酸置換後の配列となるような塩基配列を有するDNAフラグメントをDNAシンセサイザー等で合成し、得られたフラグメントと別途分離しておいたpPT-DB1の該フラグメントに相当する領域とを置換することにより、目的とする組替えプラスミドを取得することができる。

5

実施例

以下、実施例を挙げて本発明を更に詳細に説明するが、本発明は以下の実施例によって何等限定されるものではない。

以下において、反応液のHPLC分析は、カラムとしてULTRON 80H
10 G (50×8φmm)を用い、10mMリン酸水溶液を展開液として行い、アクリルアミドは220nmの吸光度により検出する。また、本発明の効果を確認するために、得られたアミド化合物含有液中に含まれるタンパク質を分析した。タンパク質濃度は、アミド化合物含有液に含まれるアミド化合物を半透膜により透析除去した後、バイオラット社製タンパク質分析キットを用いて定量し、タンパ
15 ク質除去率を求めた。

実施例1

500mlのバッフル付三角フラスコに下記の組成の培地100mlを調製し、
121℃、20分間、オートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が50
μg/mlとなるようにアンピシリンを添加した後、MT-10822株(FE
20 RM BP-5785)を一白菌耳植菌し、37℃、130rpmにて20時間
培養した。遠心分離(15000G×15分間)により菌体のみを培養液より分
離し、続いて、50mlの生理食塩水に該菌体を再懸濁した後に、再度遠心分離
を行って湿菌体を得た。

| | | | |
|----|------|-------------|----------|
| 25 | 培地組成 | 酵母エキストラクト | 5.0g/L |
| | | ポリペプトン | 10.0g/L |
| | | NaCl | 5.0g/L |
| | | 塩化コバルト・六水和物 | 10.0mg/L |
| | | 硫酸第二鉄・七水和物 | 40.0mg/L |
| | | pH | 7.5 |

上記で得られた湿菌体 1.5 g を 98.5 g の 0.3 mM-NaOH 水溶液に懸濁し、この懸濁液にアクリロニトリルを 36 g を一括添加して、10℃にて攪拌を行いながら反応した。反応開始から 24 時間後に HPLC 分析により反応液の分析を行った。その結果、反応液中にはアクリルアミドのみが存在（濃度 = 35 重量%）しており、アクリロニトリルは認められなかった。この反応液の pH は 8.0 であった。

この反応液を、10%硫酸水溶液で pH 5 に調整し、反応液に対し 2 重量%の活性炭（三倉化成（株）製 粉末活性炭 PM-SX）を添加し、25℃で 5 時間攪拌を行ったあと、濾紙にて濾過を行った。得られた濾液中のタンパク質濃度を測定したところ除去率 99% 以上であった。また、この濾液 10 ml にメタノール 100 ml を加えても白濁せず、重合物は全く認められなかった。

実施例 2

実施例 1 で得られた反応液に対し、10%アクリル酸水溶液で pH を 5 に調整した以外は、実施例 1 と同様の処理を行い濾液を得た。濾液中のタンパク質濃度を測定したところ除去率 99% 以上であった。また、この濾液 10 ml にメタノール 100 ml を加えても白濁せず、重合物は全く認められなかった。

実施例 3

ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得

α サブユニットの 6 番目の Leu を Met に置換するために、特開平 9-275978 で得られた pPT-DB1 プラスミド DNA を鋳型として、宝酒造社製の「LA PCR in vitro mutagenesis Kit」を用いた部位特異的な変異導入を行った。以後、「LA PCR in vitro mutagenesis Kit」を単にキットと呼ぶ。以下の実施例では、基本的にキットの原理および操作方法を踏襲した。

30 ml の試験管に 10 ml の LB 液体培地を調製し、121℃、20 分間オートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が 100 μ g/ml となるようにアンピシリンを添加した後、実施例 1 と同様に MT-10822 株を一白菌耳植菌し、37℃・300 rpm にて約 20 時間培養した。該培養液 1 ml を適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離（15000 rpm × 5 分）により該菌

体を分離した。続いてアルカリ SDS 抽出法により該菌体より p P T - D B 1 のプラスミド DNA を調製した。

p P T - D B 1 のプラスミド DNA 1 μ g を鋳型として 2 種類の P C R 反応を行った。P C R 反応 N o . 1 は、配列表の配列番号 1 記載のプライマー及び M 1 3 プライマー M 4 (配列表の配列番号 2 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0 μ l の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (9 8 $^{\circ}$ C) 1 5 秒、アニーリング (5 5 $^{\circ}$ C) 3 0 秒、伸長反応 (7 2 $^{\circ}$ C) 1 2 0 秒の条件を 2 5 サイクル繰り返すことにより行った。P C R 反応 N o . 2 は、M U T 4 プライマー (配列表の配列番号 3 に配列を記載) 及び M 1 3 プライマー R V (配列表の配列番号 4 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0 μ l の系 (組成はキットに記載の条件による) で、P C R 反応 N o . 1 と同様の操作により行った。P C R 反応 N o . 1 および N o . 2 の反応終了液各 5 μ l を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1 . 0 重量%) により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。M i c r o c o n 1 0 0 (宝酒造社製) を用いてそれぞれの P C R 反応終了液より過剰なプライマーおよび d N T P を除去した後、T E を加えて各々 5 0 μ l の溶液を調製した。該 T E 溶液を各 0 . 5 μ l ずつ含む全量 4 7 . 5 μ l のアニーリング溶液 (組成はキットに記載の条件による) を調製し、熱変性処理 (9 8 $^{\circ}$ C) を 1 0 分間行った後、3 7 $^{\circ}$ C まで 6 0 分間かけて一定の速度で冷却を行い、続いて 3 7 $^{\circ}$ C で 1 5 分間保持することによってアニーリング処理を行った。アニーリング処理液に T A K A R A L A T a q を 0 . 5 μ l 加えて 7 2 $^{\circ}$ C で 3 分間加熱処理を行い、ヘテロ 2 本鎖を完成させた。これに M 1 3 プライマー M 4 (配列表の配列番号 2 に配列を記載) 及び M 1 3 プライマー R V (配列表の配列番号 4 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l 加えて全量を 5 0 μ l とした後、熱変性 (9 8 $^{\circ}$ C) 1 5 秒、アニーリング (5 5 $^{\circ}$ C) 3 0 秒、伸長反応 (7 2 $^{\circ}$ C) 1 2 0 秒の条件を 2 5 サイクル繰り返すことによる P C R 反応 N o . 3 を行った。P C R 反応 N o . 3 の反応終了液 5 μ l を用いたアガロース電気泳動 (シグマ社製タイプ V I I 低融点アガロース使用; アガロース濃度 0 . 8 重量%) により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、約 2 . 0 k b p の増幅 DNA 産物の存在が確認できた。続いて、アガロースゲルから約 2 .

0 K b p の DNA 断片のみを切り出し、該アガロース片（約 0.1 g）を細かく粉砕し 1 m l の T E 溶液に懸濁後、55℃で1時間保温してアガロースを完全に融解させた。この融解液に対して常法に従ってフェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈澱を行って該 DNA 断片を精製し、最終的に 10 μ l の T E に溶解した。精製した約 2.0 k b p の増幅 DNA 断片を制限酵素 E c o R I 及び H i n d I I I により切断した後、この制限酵素処理液に対してフェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈澱を行って該 DNA 断片を精製し、最終的に 10 μ l の T E に溶解した。同様に、p P T - D B 1 上の唯一の制限酵素サイトである E c o R I および H i n d I I I により p P T - D B 1 を切断し、アガロースゲル電気泳動（シグマ社製タイプ V I I 低融点アガロース使用；アガロース濃度 0.7%）を行い、アガロースゲルから約 2.7 K b p の DNA 断片のみを切り出した。切り出したアガロース片（約 0.1 g）を細かく粉砕し 1 m l の T E 溶液に懸濁後、55℃で1時間保温してアガロースを完全に融解させた。この融解液に対してフェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈澱を行って該 DNA 断片を精製し、最終的に 10 μ l の T E に溶解した。この様にして得られた増幅 DNA 産物と p P T - D B 1 断片を DNA ライゲーションキット（宝酒造社製）を用いて連結させた後、大腸菌 H B 1 0 1 のコンピテントセル（東洋紡績社製）を形質転換し、大腸菌バンクを調製した。

30 m l の試験管に 40 μ g / m l の硫酸第二鉄・七水和物及び 10 μ g / m l の塩化コバルト・二水和物を含む 10 m l の L B 液体培地（以後、活性発現培地と呼ぶ）を調製し、121℃・20分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が 100 μ g / m l となるようにアンピシリンを添加した後、該大腸菌バンクより任意に選別した 5 クローンを各一白菌耳ずつ植菌し、37℃・300 r p m にて約 20 時間培養した。該培養終了液 1 m l をそれぞれ適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離（15000 r p m × 5 分）により菌体を分離した。該菌体を 200 μ l のリン酸カリウムバッファー（pH 7.0）に懸濁し、これに 1 重量%のアクリロニトリルを添加して 10℃で2分間反応させた。反応液にこれと等量の 1 M リン酸水溶液を添加して反応を停止させ、生成したアクリルアミド濃度を実施例 2 と同様の H P L C 分析により測定した。その結果、

5 クローン中4クローンでアクリルアミドの生成が検出され、ニトリルヒドラターゼ活性を保持していることが確認された。

ニトリルヒドラターゼ活性の測定に供した上記培養液の残部1mlより該4クローンの菌体をそれぞれ分離し、アルカリSDS抽出法により各クローンのプラスミドDNAを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたプライマーエクステンション法により各クローンのニトリルヒドラターゼ構造遺伝子の塩基配列を決定した。その結果、表1に示したクローンNo. 1においてニトリルヒドラターゼの α サブユニットの6番目のLeuがMetに置換されていた。

10

表1

| クローン番号 | 変異箇所 (α サブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|-----------------------------|-----------|-----|---------|-----|
| | | 置換前 | 置換後 | 置換前 | 置換後 |
| No. 1 | α -6番目 | Leu | Met | CTG | ATG |

続いて、 α サブユニットの126番目のPheをTyrに置換するために、クローンNo. 1のプラスミドDNAを鋳型として、上述と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

すなわち、30mlの試験管に10mlのLB液体培地を調製し、121℃・20分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が100 μ g/mlとなるようにアンピシリンを添加した後、得られたクローンNo. 1株を一白菌耳植菌し、37℃・300rpmにて約20時間培養した。該培養液1mlを適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離(15000rpm×5分)により菌体を分離した。続いてアルカリSDS抽出法により該菌体よりクローンNo. 1株のプラスミドDNAを調製した。

このクローンNo. 1株のプラスミドDNA1 μ gを鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 4は、配列表の配列番号5記載のプライマー及びM13プライマーM4(配列表の配列番号2に配列を記載)を各々50pmol含む全量50 μ lの系(組成はキットに記載の条件による)で、熱変性(9

8℃) 15秒、アニーリング (55℃) 30秒、伸長反応 (72℃) 120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 5は、MUT4プライマー (配列表の配列番号3に配列を記載) 及びM13プライマーRV (配列表の配列番号4に配列を記載) を各々50 pmol含む全量50 µlの系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR反応No. 4と同様の操作により行った。PCR反応No. 4およびNo. 5の反応終了液各5 µlを用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度1.0重量%) によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、クローンNo. 1の場合と全く同じ操作により大腸菌バンクを調製した。

- 10 該大腸菌バンクより任意に選別した5クローンをクローンNo. 1の場合と同じ活性発現培地10 mlに各一白菌耳ずつ植菌し、37℃・300 rpmにて約20時間培養した。該培養終了液1 mlをそれぞれ適当な遠心チューブに分取した後、ニトリルヒドラターゼ活性を測定した。その結果、5クローン中4クローンでアクリルアミドの生成が検出され、ニトリルヒドラターゼ活性を保持していることが確認された。

ニトリルヒドラターゼ活性の測定に供した上記培養液の残部1 mlより該4クローンの菌体をそれぞれ分離し、アルカリSDS抽出法により各クローンのプラスミドDNAを調製した。続いて、クローンNo. 1の場合と同様の操作により各クローンのニトリルヒドラターゼ構造遺伝子の塩基配列を決定した。その結果、表2に示したクローンNo. 2においてニトリルヒドラターゼのαサブユニットの6番目のLeuがMetに、αサブユニットの126番目のPheがTyrにそれぞれ置換されていた。

表2

| クローン番号 | 変異箇所 (αサブユニット内) | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|--------------------|------------|------------|------------|------------|
| | | 野生型 | 変異体 | 野生型 | 変異体 |
| No. 2 | α-6番目 α-126番目 | Leu Phe | Met Tyr | CTG TTC | ATG TAC |

続いて、βサブユニットの212番目のSerをTyrに置換するために、ク

ローンNo. 2のプラスミドDNAを鋳型として、上述と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

すなわち、30mlの試験管に10mlのLB液体培地を調製し、121℃・20分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が100μg/mlとなるようにアンピシリンを添加した後、得られたクローンNo. 2株を一白菌耳植菌し、37℃・300rpmにて約20時間培養した。該培養液1mlを適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離（15000rpm×5分）により菌体を分離した。続いてアルカリSDS抽出法により該菌体よりクローンNo. 1株のプラスミドDNAを調製した。

このクローンNo. 2のプラスミドDNA1μgを鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 6は、配列表の配列番号6記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号2に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μlの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 7は、MUT4プライマー（配列表の配列番号3に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号4に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μlの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 6と同様の操作により行った。PCR反応No. 6およびNo. 7の反応終了液各5μlを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、クローンNo. 1の場合と全く同じ操作により大腸菌バンクを調製した。

該大腸菌バンクより任意に選別した5クローンをクローンNo. 1の場合と同じ活性発現培地10mlに各一白菌耳ずつ植菌し、37℃・300rpmにて約20時間培養した。該培養終了液1mlをそれぞれ適当な遠心チューブに分取した後、ニトリルヒドラターゼ活性を測定した。その結果、5クローン中4クローンでアクリルアミドの生成が検出され、ニトリルヒドラターゼ活性を保持していることが確認された。

ニトリルヒドラターゼ活性の測定に供した上記培養液の残部1mlより該4ク

ローンの菌体をそれぞれ分離し、アルカリ SDS 抽出法により各クローンのプラスミド DNA を調製した。続いて、クローン No. 1 の場合と同様の操作により各クローンのニトリルヒドラターゼ構造遺伝子の塩基配列を決定した。その結果、表 3 に示したクローン No. 3 においてニトリルヒドラターゼの β サブユニットの 212 番目の Ser が Tyr に置換されていた。

表3

| クローン番号 | 変異箇所 | アミノ酸配列の変化 | | 塩基配列の変化 | |
|--------|---|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | | 野生型 | 変異体 | 野生型 | 変異体 |
| No. 3 | α -6 番目 α -126 番目 β -212 番目 | Leu Phe Ser | Met Tyr Tyr | CTG TTC TCC | ATG TAC TAC |

このクローン NO. 3 の菌体を実施例 1 と同様に培養し、反応に必要な菌体を得た。

更に、得られた湿菌体 1.5 g を 98.5 g の 0.3 mM-NaOH 水溶液に懸濁し、この懸濁液にアクリロニトリルを 60 g 一括添加して、10℃にて攪拌を行いながら反応した。反応開始から 24 時間後に HPLC 分析により反応液の分析を行った。その結果、反応液中にはアクリルアミドのみが存在（濃度 = 50 重量%）しており、アクリロニトリルは認められなかった。この反応液の pH は 8.0 であった。

この反応液を、10%硫酸水溶液で pH 5 に調整し、反応液に対し 2 重量%の活性炭（三倉化成（株）製 粉末活性炭 PM-SX）を添加し、25℃で 5 時間攪拌を行ったあと、濾紙にて濾過を行った。得られた濾液中のタンパク質除去率を測定したところ、除去率 99%以上であった。また、この濾液 10 ml にメタノール 100 ml を加えても白濁せず、重合物は全く認められなかった。

実施例 4

実施例 3 で得られた水和反応液に対し、10%硫酸水溶液で pH を 3 に調整した以外は、実施例 1 と同様の処理を行い濾液を得た。濾液中のタンパク質除去率を測定したところ除去率 75%であった。また、この濾液 10 ml にメタノール

100 ml を加えても白濁せず、重合物は全く認められなかった。

比較例 1

実施例 3 で得られた水和反応液に対し、10%硫酸水溶液で pH を 7 に調整した以外は、実施例 1 と同様の処理を行い濾液を得た。濾液中のタンパク質除去率
5 を測定したところ除去率 25% であった。

発明の効果

以上の説明、特に上記実施例および比較例の結果からも明らかなように、本発明の方法によれば、従来の活性炭による精製方法に比べ、酸性下で活性炭と接触
10 させることにより、遙かに効果的にアミド化合物の精製を行うことができる。特に、本発明の方法により精製されたアクリルアミドを重合したとき、高分子量で、保存安定性に優れ、また、高い水溶性を有するポリアクリルアミドを得ることができる。

請 求 の 範 囲

1. アミド化合物含有液を酸性条件下で活性炭と接触させることを特徴とするアミド化合物の精製方法。
- 5 2. アミド化合物含有液が、対応するニトリル化合物の水和反応により得られる生成液である 1 に記載の精製方法。
3. アミド化合物が炭素数 2 ～ 20 のものである、2 に記載の精製方法。
4. アミド化合物が不飽和結合を有するものである、3 に記載の精製方法。
5. アミド化合物が、ニトリルヒドラーゼを含有する微生物菌体、または該微生物菌体の処理物を用いてニトリル化合物の水和反応で製造されたものである、
10 2 または 3 に記載の精製方法。
6. 微生物菌体が、微生物よりクローニングしたニトリルヒドラーゼ遺伝子を任意の宿主で発現させた形質転換体である、5 に記載の精製方法。
7. アミド化合物が、ニトリルヒドラーゼを含有する微生物菌体、または該微生物菌体の処理物を用いてニトリル化合物の水和反応で製造されたものである、
15 4 に記載の精製方法。
8. 微生物菌体が、微生物よりクローニングしたニトリルヒドラーゼ遺伝子を任意の宿主で発現させた形質転換体である、7 に記載の精製方法。
9. アミド化合物がアクリルアミドまたはメタクリルアミドである、7 に記載の
20 精製方法。
10. アミド化合物がアクリルアミドまたはメタクリルアミドである、8 に記載の精製方法。
11. 活性炭との接触時のアミド化合物含有液の pH が 3.5 ～ 6.5 である、
9 または 10 に記載の精製方法。
- 25 12. 酸解離指数 3.5 ～ 5.5 の有機酸、または該有機酸と塩基を用いてアミド化合物含有液を酸性に調製することを特徴とする、11 に記載の精製方法。
13. 有機酸がアクリル酸またはメタクリル酸である、12 に記載の精製方法。
14. 活性炭が、木質またはヤシ殻を原料とした活性炭である、13 に記載の精製方法。

15. 活性炭との接触時の温度が10～50℃である、14に記載の精製方法。

16. アミド化合物含有液を活性炭と接触させた後、アミド含有液から活性炭を分離した液を飽和温度以下として結晶を析出させることを特徴とする、15に記載の精製方法。

「配列表」

< 1 1 0 > Mitsui Chemicals Inc.

< 1 2 0 > Process for purifying amide compounds

< 1 3 0 > F - 1 8 9 2

5 < 1 5 0 > J P 2 0 0 0 - 0 0 7 9 9 3

< 1 5 1 > 2 0 0 0 - 0 1 - 1 7

< 1 6 0 > 6

< 2 1 0 > 1

10 < 2 1 1 > 1 8

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

< 4 0 0 > 1

15 aacatcatgc gcaagtcg 18

< 2 1 0 > 2

< 2 1 1 > 1 7

< 2 1 2 > DNA

20 < 2 1 3 > Artificial Sequence

< 4 0 0 > 2

caggaaacag ctatgac 17

25 < 2 1 0 > 3

< 2 1 1 > 2 0

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence



< 4 0 0 > 3

ggccagtgcc tagcttacat 20

< 2 1 0 > 4

5 < 2 1 1 > 1 7

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

< 4 0 0 > 4

10 gttttcccag tcacgac 17

< 2 1 0 > 5

< 2 1 1 > 1 8

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

15

< 4 0 0 > 5

aactggtaca aggagccg 18

< 2 1 0 > 6

20 < 2 1 1 > 1 8

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

< 4 0 0 > 6

25 ccgaactaca gcgtctac 18



v

v

.

v

o

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/JP01/00131

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07C231/24, 233/09, C12P13/02 // C07C231/06, C12N15/60 (C12N15/60, C12R1:19) (C12P13/02, C12R1:19)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C07C231/24, 231/06, 233/09, C12P13/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN) "ACRYLAMID? AND (ACTIV? (W) CARBON? OR ACTIV? (W) CHARCOAL?) AND (PH OR ACID?)"

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| X | Chemical Abstracts, Vol.127, 1997, abstract No.346682, LI, Y et al. "Purification of acrylamide in aqueous solution by activated carbon," | 1, 3, 4 |
| Y | Yingyong Huaxue, 1997, Vol.14, No.5, pp.77-79 | 2, 5-16 |
| X | US, 3923741, A (Asano et al.), 02 December, 1975 (02.12.75), | 1-4 |
| Y | Claims; Column 6, line 55 to Column 7, line 19 & NL, 7216470, A & DE, 2259096, A & FR, 2164324, A & JP, 48-62713, A & JP, 48-62714, A & JP, 48-62715, A & GB, 1404798, A | 5-16 |
| Y | JP, 11-89575, A (Mitsui Chemicals, Ltd.), 06 April, 1999 (06.04.99), Claims; Par. No. [0034] (Family: none) | 2, 5-16 |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
07 February, 2001 (07.02.01)

Date of mailing of the international search report
20 February, 2001 (20.02.01)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



✓

✓

✓

✓

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁷ C07C231/24, 233/09, C12P13/02 // C07C231/06, C12N15/60 (C12N15/60, C12R1:19) (C12P13/02, C12R1:19)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁷ C07C231/24, 231/06, 233/09, C12P13/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS(STN) "ACRYLAMID? AND (ACTIV?(W)CARBON? OR ACTIV?(W)CHARCOAL?) AND (PH OR ACID?)"

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|------------------|
| X | Chemical Abstracts, Vol.127, 1997, abstract No.346682, LI,Y et al. "Purification of acrylamide in aquerous solution by activated carbon" | 1, 3, 4 |
| Y | Yingyong Huaxue, 1997, Vol.14, No.5, p.77-79 | 2, 5-16 |
| X | US, 3923741, A (Asano et al.) 2.12月.1975 (02.12.75) 特許請求の範囲, 第6欄第55行-第7欄第19行 | 1-4 |
| Y | &NL, 7216470, A &DE, 2259096, A &FR, 2164324, A &JP, 48-62713, A &JP, 48-62714, A &JP, 48-62715, A &GB, 1404798, A | 5-16 |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07.02.01

国際調査報告の発送日

20.02.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査E: (権限のある職員)

衛見 武志

4H

9547

電話番号 03-3581-1101 内線 3443

| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | |
|-----------------------|--|------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| Y | JP, 11-89575, A (三井化学株式会社) 6. 4月. 1999 (06. 04. 99) 特許請求の範囲, 【0034】 (ファミリーなし) | 2, 5-16 |